昆虫学报 *Acta Entomologica Sinica*, August 2018, 61(8): 885 – 894 doi:10.16380/j.kcxb.2018.08.001

Ras 信号通路通过激活转录因子 *Myc* 促进核内复制细胞生长

张祥乐[1], 马 俐[2,3], 马 倩[2], 李 胜[1], 刘素宁[1,*]

(1. 华南师范大学生命科学学院昆虫科学与技术研究所, 广州 510631;
2. 中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所, 上海 200032;
3. 上海交通大学附属儿童医院, 上海 200040)

摘要:【目的】果蝇 Ras 信号通路在细胞增殖与生长过程中发挥着重要的作用。*Myc* 基因是 bHLH 转录因子家族基因,可调控细胞生长、竞争和再生增殖等生理过程。本研究旨在明确 Ras 信号通路与 *Myc* 的关系,探索 Ras 信号调控核内复制细胞生长的作用机制。【方法】生物信息学分析转基因家蚕 *Bombyx mori* 后部丝腺 *Myc* 基因的转录水平,并通过 qPCR 验证;在黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* Kc 细胞中,分别转染 pAc5.1-HisB-Ras^{V12}-*V5* 或 pAc5.1-HisB-*Raf-Flag* 过表达 Ras^{V12} 或 *Raf* 后,通过 qPCR 和 Western blot 技术分别检测 *Myc* 基因在 mRNA 和蛋白水平的相对表达量;在黑腹果蝇幼虫脂肪体和唾液腺中,结合黑腹果蝇遗传工具和分子生物学手段,验证 Ras 信号通路对 *Myc* 基因的调控作用。【结果】家蚕后部丝腺过表达 $Ras1^{CA}$ 上调 *Myc* 转录水平。激活 Ras 信号使得黑腹果蝇 Kc 细胞内 *Myc* 在转录水平和蛋白水平上的表达量上调;黑腹果蝇幼虫唾液腺和脂肪体中,游走期 *Myc* 基因的表达量高于取食期;过表达 *Myc* 或激活 Ras 信号可以促进细胞核内周期进程;激活 Ras 信号促进 *Myc* 表达。【结论】Ras 信号通路激活 *Myc* 表达,促进细胞核内周期进程,促进器官发育。

关键词: 黑腹果蝇; 家蚕; 唾液腺; 脂肪体; Ras 信号通路; Myc; 核内周期

中图分类号: Q963 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2018)08-0885-10

Ras signaling pathway promotes the growth of endoreplication cells through activating the expression of transcription factor *Myc*

ZHANG Xiang-Le[1], MA Li[2,3], MA Qian[2], LI Sheng[1], LIU Su-Ning[1,*] (1. Institute of Insect Science and Technology, School of Life Sciences, South China Normal University, Guangzhou 510631, China; 2. Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China; 3. Children's Hospital of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200040, China)

Abstract:【Aim】Ras signaling pathway palys an important role in cell proliferation and growth in *Drosophila*. *Myc*, a member of basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factor family, regulates physiological processes such as cell growth, competition and tissue regeneration. The aim of this study is to clarify the interaction between Ras signaling and *Myc*, and to explore the mechanism how Ras signaling regulates the growth of endoreplication cells.【Methods】The transcription level of *Myc* in posterior silk glands of transgenic silkworm (*Bombyx mori*) was analyzed by bioinformatics tools and detected by

基金项目: 国家自然科学基金项目(31702054)
作者简介: 张祥乐, 男, 1993 年 3 月生, 河南信阳人, 硕士研究生, 研究方向为昆虫发育生物学, E-mail: simplehappy03@163.com
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: liusuning@m.scnu.edu.cn
收稿日期 Received: 2018-06-07; 接受日期 Accepted: 2018-06-28

qPCR. Ras^{V12} or *Raf* were overexpressed by transfecting pAc5.1-HisB-Ras^{V12}-V5 or pAc5.1-HisB-*Raf-Flag* plasmid into *Drosophila melanogaster* Kc cells, respectively, and the mRNA and protein expression levels of *Myc* were detected by qPCR and Western blotting, respectively. The functions of Ras signaling in regulation of *Myc* in larval fat body and salivary glands of *D. melanogaster* were verified by using *D. melanogaster* genetic tools and molecular biology methods. 【Results】 Overexpression of $Ras1^{CA}$ in silkworm posterior silk glands up-regulated *Myc* transcriptional level. Activation of Ras signaling up-regulated *Myc* expression at both the transcriptional and protein levels in *D. melanogaster* Kc cells. In salivary glands and fat body of *D. melanogaster* larva, the expression levels of *Myc* at the wandering stage were higher than those at the feeding stage. Overexpression of *Myc* or activation of Ras signaling accelerated endocycling. Activating Ras signaling promoted *Myc* expression.【Conclusion】 The Ras signaling pathway can activate the expression of *Myc*, thereby accelerating the endocycle and promoting organ development.

Key words: *Drosophila melanogaster*; *Bombyx mori*; salivary gland; fat body; Ras signaling pathway; Myc; endocycle

核内复制(endoreplication)细胞广泛存在于动植物中,异于普通细胞的细胞周期,核内周期(endocycle)保留 DNA 复制时期(S 期)和细胞间期(G 期),而失去分裂期(M 期)和胞质分裂(cytokinesis)过程(Calvi, 2013)。果蝇幼虫生长的完成非常依赖核内复制,是因为多数幼虫组织都是由核内复制细胞组成的,如唾液腺、脂肪体、前胸腺、表皮、肠道、气管、马氏管等等(Edgar and Nijhout, 2004; Lee *et al*., 2009)。众多核内周期调节者构成精密而复杂的调控网络确保核内周期顺利完成(Lee *et al*., 2009),其中细胞周期蛋白 E(Cyclin-E, CycE)和细胞周期蛋白依赖激酶 2(cyclin-dependent kinases 2, CDK2)是 S 期的主要调节者,*CycE* 突变使得细胞的 DNA 复制终止,*CDK*2 突变使得唾液腺细胞核内周期终止,过表达 *CycE* 可有效挽救因饥饿而停止的核内复制细胞的 DNA 复制(Knoblich *et al*., 1994; Britton and Edgar, 1998; Zielke *et al*., 2011)。许多信号通路可通过调控包括 CycE/CDK2 及上下游核内周期调节者来影响核内复制进程(Lee *et al*., 2009),Ras 信号通路被认为是候选者之一。

果蝇 *Drosophila* Ras oncogene at 85D (Ras85D) 信号参与调控细胞存活、生长和增殖等组织发育中的生理过程(Rommel and Hafen, 1998; Lusk *et al*., 2017)。激活态 Ras 招募并结合 Raf oncogene (Raf) 并使之聚集至细胞膜,随后被蛋白激酶如蛋白激酶 C 等磷酸化为激活态 Raf (Stokoe *et al*., 1994; Marais *et al*., 1995; Avruch *et al*., 2001);激活态 Raf 磷酸化其下游蛋白 Dsor1 (MEK),MEK 磷酸化 Rolled (ERK) (Crews and Erikson, 1993);ERK 的磷酸化促进自身二聚化,并由细胞质向细胞核内转移(Khokhlatchev *et al*., 1998);通过直接磷酸化而增强多种转录因子如 Elk-1 和 Ets-2 等的活力,从而调控细胞生长(Marais *et al*., 1993; Treisman, 1996)。前人研究发现,Ras 信号促进核内复制细胞组织发育,激活前胸腺中 Ras 信号可明显增大细胞体积并促进蜕皮激素前体的合成(Caldwell *et al*., 2005)。家蚕 *Bombyx mori* 后部丝腺被看作是果蝇唾液腺的同源器官(Xin *et al*., 2015),同样为核内复制细胞;马俐等利用转基因技术在家蚕后部丝腺组织中特异过表达激活态 *Ras*1(家蚕中 *Ras* 同源基因),发现家蚕后部丝腺细胞体积明显增大,核内复制加速,进而促进后部丝腺增大与蚕丝蛋白的合成,最终提高了蚕丝产量(Ma *et al*., 2011)。

Myc 属于 bHLH 转录因子家族成员,包含 bHLH-LZ 结构域,通过与 Max 形成异二聚体并与靶标基因启动子区域的 E-Box 结合位点"CACGTG"结合,激活靶标基因转录(Gallant *et al*., 1996; Hulf *et al*., 2005)。Mnt 与 Max 形成异二聚体可抑制 Myc-Max 异二聚体引起的靶标基因转录(Loo *et al*., 2005)。Myc/Max/Mnt 形成调控网络,共同维持协调 Myc 在细胞生长中的重要作用(Gallant, 2013)。果蝇中只有单个 *Myc* 基因,而哺乳动物中则含有多种 Myc 家族蛋白,共同协调机体发育(Gallant *et al*., 1996; Penzo-Méndez and Stanger, 2014)。Myc 作为转录因子,也受到许多信号通路的调控,如 Wnt, EGFR, Hippo, JAK/STAT 和 Notch 等信号通路(You *et al*., 2002; Weng *et al*., 2006; Muthuswami *et al*., 2013; Ren *et al*., 2013)。对哺乳动物研究发现

Ras 信号、Myc 和细胞周期转录因子之间存在着紧密的联系：活化的 Ras 可促进细胞周期调控因子如 Cyclin-D1（CycD1）和 CycE 以及细胞周期蛋白依赖激酶（cyclin-dependent kinases，CDKs）等的表达（Aktas *et al*.，1997；Rodriguez-Viciana *et al*.，2005）；Myc 作为细胞生长的转录调控因子，可调控 CycD1，Cyclin-D2，CycE 和 CDK4 等因子，促进细胞周期由 G_0/G_1 向 S 期过渡（Skouteris and Schroder，1996；Steiner *et al*.，1996；Horiuchi *et al*.，2012）。

昆虫核内复制细胞与有丝分裂细胞的细胞周期进程不同，Ras 信号通路与 *Myc* 的相互作用关系以及对核内复制细胞的调控机理仍不清楚。本实验室前期研究发现，超表达 *Ras1*^{CA} 的家蚕后部丝腺中 *Myc* 的表达量显著上升，家蚕后部丝腺为核内复制细胞（Ma *et al*.，2011）。但由于家蚕的局限性，我们选取模式生物黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 为实验对象来进行深一步的研究，通过相关的分子实验，进一步阐释 Ras 信号和 *Myc* 二者之间的相互作用机理，为深入研究基因或信号通路调控核内复制细胞生长的分子机理提供参考。

1　材料与方法

1.1　果蝇品系及家蚕饲养

转基因黑腹果蝇：*W*^{1118}，*Ptc-Gal4*，*Lsp2-Gal4*，*tub-Gal80*^{ts}，*UAS-Ras*^{V12}，*UAS-Raf*^{GOF}，*UAS-Myc*^{132} 购自 Bloomington 果蝇中心。制作克隆细胞：选用黑腹果蝇品系 *W*^{1118}，*hs-Flp*；*Act5C > CD2 > Gal4*，*UAS-RFP/TM3* 分别与上述 UAS 品系杂交的后代，通过热激获得组织克隆细胞。所有品系均用标准的玉米酵母培养基饲养，放在恒温培养箱中培养，光周期为 12L∶12D，相对湿度为 60%，温度为 25℃。家蚕野生型品系大造和转基因家蚕 *Fil > Ras1*^{CA} 均由中国科学院上海生命科学研究院植物生理与生态研究所提供，标准化饲养（Ma *et al*.，2011）。

1.2　*Ras*^{V12}*-V5* 和 *Raf-Flag* 基因重组表达质粒的构建

提取野生型 *W*^{1118} 果蝇总 RNA，通过反转录构建果蝇 cDNA 文库，根据黑腹果蝇 *Ras*（GenBank 登录号：AAF54388.1）和 *Raf*（GenBank 登录号：AAF45774.1）基因编码区序列，PCR 扩增获得 *Ras* 和 *Raf* 的全长 cDNA。实验所用引物见表 1。PCR 反应体系（50 μL）：5 × PCR buffer 10 μL，dNTPs（2.5 mmol/L）4 μL，Prime-STAR DNA Polymerase（2.5 U/μL）1 μL，上下游引物（10 μmol/L）各 2 μL，黑腹果蝇 cDNA 2 μL，超纯水 29 μL。PCR 反应条件：98℃ 预变性 3 min；98℃ 10 s，60℃ 5 s，72℃ 3 min，32 个循环；72℃ 10 min。*Ras* 和 *Raf* 序列连接到 pMD-18T 载体（TaKaRa 公司）上，再以 pMD-18T-*Ras* 和 pMD-18T-*Raf* 为模板，利用 *Ras* 上游引物（5′-CCGGAATTCATGGGTAAGCCTATCCCTAACCCTCTCCTCGGTCTCGATTCTACGACGGAATACAAACTGGTCG-3′，下划线分别为 *Eco*R Ⅰ 酶切位点、V5 标签序列）和下游引物（5′-GCTCTAGATTAGAGCATTTTACATTTAAATCTACGA-3′，下划线为 *Xba*Ⅰ酶切位点），进行 PCR 扩增得到 *Ras-V5* 序列。利用 *Raf* 上游引物（5′-CCGGAATTCATGGATTACAAGGATGACGACGATAAGTCCAGCGAGTCCTCCAC-3′，下划线分别为 *Eco*R Ⅰ 酶切位点和 Flag 标签序列）和下游引物（5′-GCTCTAGACTAGATATTCCCAGCGCTGC-3′，下划线为 *Xba* Ⅰ 酶切位点），进行 PCR 扩增得到 *Raf-Flag* 序列。PCR 反应体系（50 μL）：5 × PCR buffer 10 μL，dNTPs（2.5 mmol/L）4 μL，Prime-STAR DNA Polymerase（2.5 U/μL）1 μL，上下游引物（10 μmol/L）各 2 μL，cDNA 2 μL，超纯水 29 μL。PCR 反应条件：98℃ 变性 3 min；98℃ 10 s，60℃ 5 s，72℃ 3 min，32 个循环；72℃ 10min。PCR 产物 4℃ 保存待用。*Ras-V5* 序列通过 pClone007 Blunt Vector Kit 试剂盒（北京擎科）连接到 pClone007 载体上，再用突变引物（上游引物：5′-TCGTCGTTGGAGCCGTAGGCGTGGGCAAGTCCGCG-3′；下游引物：5′-TACGGCTCCAACGACGACCAGTTTGTATTCCG-3′。下划线为碱基突变位置）进行 PCR 扩增，PCR 反应体系（50 μL）：5 × PCR buffer 10 μL，dNTPs（2.5 mmol/L）4 μL，Prime-STAR DNA Polymerase（2.5 U/μL）1 μL，上下游引物（10 μmol/L）各 2 μL，cDNA 2 μL，超纯水 29 μL。PCR 反应条件：98℃ 变性 3 min；98℃ 10 s，60℃ 5 s，72℃ 3 min，32 个循环；72℃ 10 min。使得 Ras 的第 12 位氨基酸由甘氨酸突变为缬氨酸，从而获得激活态 *Ras*^{V12}。将 *Ras*^{V12} 与 *Raf* 序列分别插入 pAc5.1-HisB 载体（Invitrogen），通过鉴定后获得 pAc5.1-HisB-*Ras*^{V12}*-V5* 和 pAc5.1-HisB-*Raf-Flag* 两个重组质粒。

1.3　细胞培养

果蝇 Kc 细胞（Thermo Fisher）培养在加入 5% 的胎牛血清（HyClone）的施耐德果蝇培养基（Schneider's Drosophila Medium，Lonza）中，27℃ 恒温培养箱培养，用 Effectene Transfection Reagent 试

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

引物 Primers	引物序列(5′-3′) Primer sequences	引物用途 Usage of primers
Ras-F	ATGACGGAATACAAACTGGT	开放阅读框扩增 Amplification of ORF
Ras-R	TTAGAGCATTTTACATTTAA	
Raf-F	ATGTCCAGCGAGTCCTCCAC	
Ras-R	CTAGATATTCCCAGCGCTGC	
Ras-V5-F	CCGGAATTCATGGGTAAGCCTATCCCTAACCCTCTCCTCGGTCTCGATTCTACGACGG AATACAAACTGGTCG	带标签基因扩增 Amplification of tagged gene
Ras-V5-R	GCTCTAGATTAGAGCATTTTACATTTAAATCTACGA	
Raf-Flag-F	CCGGAATTCATGGATTACAAGGATGACGACGATAAGTCCAGCGAGTCCTCCAC	
Raf-Flag-R	GCTCTAGACTAGATATTCCCAGCGCTGC	
Ras^{V12}-V5-F	TCGTCGTTGGAGCCGTAGGCGTGGGCAAGTCCGCG	突变基因扩增 Amplification of mutant gene
Ras^{V12}-V5-R	TACGGCTCCAACGACGACCAGTTTGTATTCCG	
Bm-Myc-F	CATATCACCGTCGAGACCTG	实时荧光定量 PCR qPCR
Bm-Myc-R	GTCTCGCCAAAGTGTACGAA	
Bm-rp49-F	CAGGCGGTTCAAGGGTCAATAC	
Bm-rp49-R	TGCTGGGCTCTTTCCACGA	
Myc-F	CAGTTCGAACAAGGGACGCA	
Myc-R	CCACCTTCTTGCCACGACTC	
rp49-F	GACAGTATCTGATGCCCAACA	
rp49-F	CTTCTTGGAGGAGACGCCGT	

剂盒(QIAGEN)向果蝇 Kc 细胞中转染 pAc5.1-HisB-*Ras*^{V12}-*V5* 和 pAc5.1-HisB-*Raf-Flag* 质粒。转染 36 h 后,收集细胞进行下一步分子实验。

1.4 *Myc* 基因表达水平分析

基于转基因家蚕 *Fil* > *Ras1*^{CA} 后部丝腺转录组测序(Ma *et al*., 2014)结果,本研究通过生物信息学分析,比较野生型家蚕和转基因家蚕 *Fil* > *Ras1*^{CA} 的后部丝腺中转录因子 *Myc* 基因的转录水平。收集野生型和 *Fil* > *Ras1*^{CA} 转基因家蚕后部丝腺,Trizol (TaKaRa)提取组织总 RNA,取 2 μg RNA 进行反转录,合成 cDNA 第 1 链,家蚕 *Myc* 基因 qPCR 引物为:Bm-Myc-F:5′-CATATCACCGTCGAGACCTG-3′;Bm-Myc-R:5′-GTCTCGCCAAAGTGTACGAA-3′。内参基因 *Bm-rp*49 引物为:rp49-F:5′-CAGGCGGTTCAAGGGTCAATAC-3′;rp49-R:5′-TGCTGGGCTCTTTCCACGA-3′。qPCR 反应体系(20 μL):SYBR-Green Mix 10 μL,上下游引物(10 μmol/L)各 1 μL,cDNA 2 μL,超纯水 6 μL。反应条件:95℃预变性 2 min;95℃变性 15 s,55℃退火 10 s,40 个循环;95℃变性 1 min,55℃退火 1 min,95℃变性 15 s。绘制产物溶解曲线。以家蚕 *rp*49 基因作为内标参考,分别进行 4 个生物学重复,3 个技术重复。

收集野生型果蝇 *W*^{1118} 幼虫取食期和游走期的脂肪体和唾液腺组织,收集 3 种基因型果蝇 *Lsp2-Gal*4;*Lsp2-Gal*4,*UAS-Ras*^{V12};*Lsp2-Gal*4,*UAS-Raf*^{GOF} 幼虫游走期脂肪体组织。将基因型 *Ptc-Gal*4,*tub-Gal80*^{ts};*Ptc-Gal*4,*tub-Gal80*^{ts},*UAS-Ras*^{V12};*Ptc-Gal*4,*tub-Gal80*^{ts},*UAS-Raf*^{GOF} 的果蝇卵置于 18℃培养 72 h 后转移至 30℃培养箱,取幼虫游走期脂肪体和唾液腺组织。收集 1.3 节转染重组质粒的果蝇 Kc 细胞,Trizol (TaKaRa)分别提取上述组织和细胞的总 RNA,取 2 μg RNA 进行反转录合成 cDNA 第 1 链,*Myc* 基因 qPCR 引物为:Myc-F:5′-CAGTTCGAACAAGGGACGCA-3′;Myc-R:5′-CCACCTTCTTGCCACGACTC-3′。内参基因 *rp*49 的 qPCR 引物为:rp49-F:5′-GACAGTATCTGATGCCCAACA-3′;rp49-R:5′-CTTCTTGGAGGAGACGCCGT-3′。qPCR 反应体系(20 μL):SYBR-Green Mix 10 μL,上下游引物(10 μmol/L)各 1 μL,cDNA 2 μL,超纯水 6 μL。反应条件:95℃预变性 2 min;95℃变性 15 s,60℃退火 20 s,40 个循环;95℃变性 15 s,60℃退火 1 min,95℃变性 15 s。绘制产物溶解曲线。以果蝇 *rp*49 基因作为内标参考,分别进行 4 个生物学重复,3 个技术重复。

1.5 Western blotting

收集 1.3 节转染后 36 h 的果蝇 Kc 细胞,提取其总蛋白,通过 BCA 蛋白浓度测定试剂盒(上海翊圣生物),将所提取的蛋白进行定量,加入蛋白 Loading buffer 后煮沸、进行 SDS-PAGE 电泳。电泳结束后,将 PVDF 膜放入甲醇中浸泡 2 min,转膜(100 V, 100 min)完成后,将膜放入 3% BSA TBST 缓冲液中封闭 0.5 h,一抗 1∶2 000,4℃孵育过夜,

TBST 洗 3 次（每次 15 min）；二抗 1∶5 000，4℃孵育 3 h，TBST 洗 3 次（每次 15 min），在暗房中显影曝光。一抗：Tubulin（碧云天生物），标签抗体 V5 和 Flag（Invitrogen）；二抗：HRP 标记羊抗鼠二抗（Invitrogen），蛋白预染 Marker（Invitrogen）。

1.6　组织克隆细胞的制备及免疫组化

PBS 缓冲液中解剖获得黑腹果蝇野生型 W^{1118} 取食期和游走期的脂肪体和唾液腺组织待用。黑腹果蝇 W^{1118}，*hs-Flp*；*Act5C > CD2 > Gal4*，*UAS-RFP/TM3* 分别于与 *UAS-Ras*^{V12}，*UAS-Raf*^{GOF}，*UAS-Myc*^{132} 杂交，杂交黑腹果蝇开始产卵后，收集 24 h 黑腹果蝇卵，将含有卵的食物管置于 37℃水浴热激 30 min，再移至 25℃培养至幼虫游走期，在 PBS 缓冲液中解剖获得脂肪体和唾液腺组织待用。将上述获得的各基因型唾液腺和脂肪体分别转移至 4% 的甲醛溶液中孵育 40 ~ 60 min 后，用 PBT 缓冲液（PBS + BSA + Triton）多次清洗，一抗 4℃过夜，回收一抗，PBT 清洗并加入二抗，室温避光孵育 1 ~ 2 h，最后置于含 50% 甘油溶液中封片保存。本研究所用一抗：Myc 抗体（1∶200，Santa Cruz）。二抗：Alexa Fluor 488 Goat Anti-rabbit IgG（1∶200，Invitrogen）。细胞核染料 DAPI（1∶100 000，碧云天生物）。共聚焦显微镜（Olympus FV3000）进行拍照，观察解剖组织抗体染色情况，并保存。图片使用 Photoshop CS6 进行剪切或添加文字等。

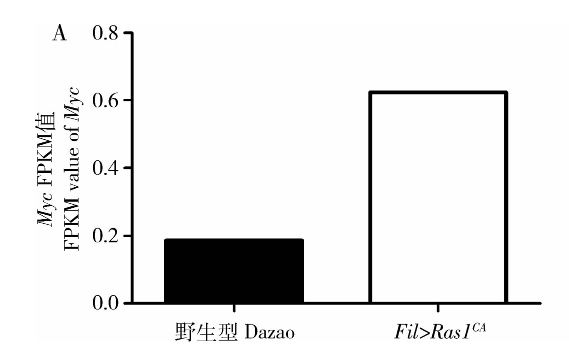
1.7　数据统计分析

采用 SPSS21.0 软件对基因表达量数据进行 *T* 检验统计学分析。

2　结果

2.1　家蚕后部丝腺过表达 *Ras1*^{CA} 上调 *Myc* 转录水平

本实验室前期研究发现，在家蚕后部丝腺中过表达 *Ras1*^{CA} 促进后部丝腺增大与蚕丝蛋白的合成（Ma *et al*.，2011）；随后对转基因家蚕 *Fil > Ras1*^{CA} 后部丝腺进行了转录组测序（Ma *et al*.，2014）。基于测序结果，本研究生物信息学分析显示，同野生型家蚕相比，转基因家蚕后部丝腺中转录因子 Myc 基因转录水平显著提高（图 1：A）；通过 qPCR 验证得到类似的结果，*Myc* 转录水平明显上调（图 1：B）。家蚕后部丝腺属于核内复制细胞，因此我们推测激活 Ras 信号促进后部丝腺细胞增大有可能是通过促进 *Myc* 表达进而促进细胞核内复制来实现的。



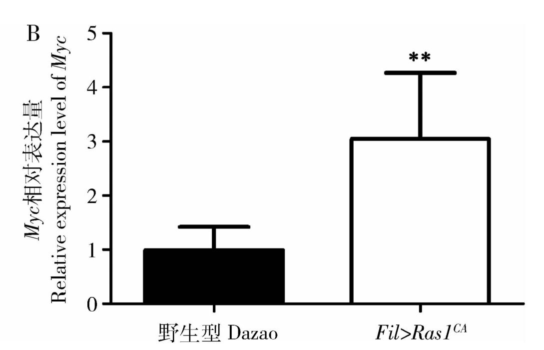


图 1　家蚕后部丝腺过表达 *Ras1*^{CA} 上调 *Myc* 转录水平

Fig. 1　Overexpression of *Ras1*^{CA} up-regulates *Myc* transcriptional level in posterior silk glands of silkworm (*Bombyx mori*)

A：生物信息学分析表明相对于野生型家蚕品系大造，转基因家蚕 *Fil > Ras1*^{CA} 后部丝腺中 *Myc* 的转录水平明显上调 Bioinformatics analysis revealed that *Myc* transcriptional level was up-regulated in transgenic strain *Fil > Ras1*^{CA} as compared with in the wild-type strain Dazao. B：qPCR 实验验证发现，*Fil > Ras1*^{CA} 后部丝腺中 *Myc* 转录水平比野生型家蚕品系大造中明显上调 qPCR results revealed that *Myc* transcriptional level was up-regulated in posterior silk glands of *Fil > Ras1*^{CA} by qPCR as compared with in the wild-type strain Dazao. ** $P < 0.01$（*T* 检验 *T*-test）.

2.2　果蝇 Kc 细胞过表达 *Ras*^{V12} 或 *Raf* 上调 *Myc* 转录和蛋白表达水平

为验证 Ras 信号介导 *Myc* 基因调控核内复制，首先在果蝇 Kc 细胞中转染携带激活态 *Ras*^{V12} 或 *Raf* 的 pAc5.1-HisB-*Ras*^{V12}-*V5* 与 pAc5.1-HisB-*Raf-Flag* 质粒，培养 36 h 后发现，与 2.1 节中家蚕结果一致，*Myc* 的转录水平和蛋白水平明显上调（图 2）。结果说明，Ras 信号可以激活 *Myc* 的表达。

2.3　黑腹果蝇幼虫脂肪体和唾液腺中 *Myc* 游走期表达量高于取食期

免疫组化结果表明，Myc 作为转录因子，主要定位在细胞核中，相对于取食期，游走期黑腹果蝇唾液腺和脂肪体中 *Myc* 的表达量明显上调（图 3：A – H）；qPCR 得到类似的结果（图 3：I，J）。结果说明，*Myc* 与唾液腺和脂肪体的生长发育有相关性。

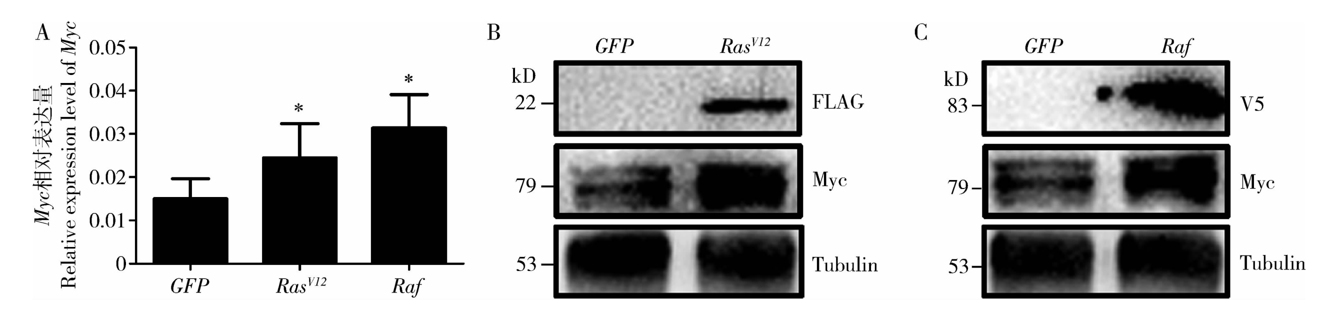


图 2　黑腹果蝇 Kc 细胞过表达 Ras^{V12} 或 *Raf* 上调 *Myc* 转录(A)和蛋白(B, C)水平

Fig. 2　Overexpression of Ras^{V12} or *Raf* up-regulates *Myc* expression at both transcriptional (A) and protein (B, C) levels in Kc cells of *Drosophila melanogaster*

A: qPCR; B, C: Western blot. * $P<0.05$ (*T* 检验 *T*-test).

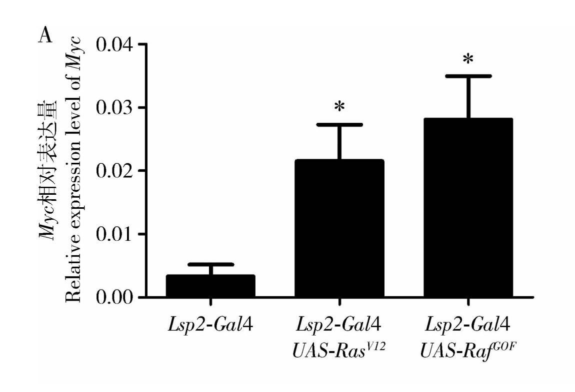
图 3　*Myc* 在取食期和游走期的黑腹果蝇脂肪体和唾液腺中的表达水平

Fig. 3　Expression levels of *Myc* in fat body and salivary glands of *Drosophila melanogaster* at the feeding stage and wandering stage

A, C: 脂肪体, Myc 抗体染色 Fat body, Myc antibody staining; B, D: 脂肪体, DAPI 染色 Fat body, DAPI staining; E, G: 唾液腺, Myc 抗体染色 Salivary gland, Myc antibody staining; F, H: 唾液腺, DAPI 染色 Salivary gland, DAPI staining. A-H: 免疫组化结果显示,无论脂肪体还是唾液腺中,游走期的 Myc 蛋白水平比取食期的高 Immunohistochemistry results showed that the Myc protein levels in fat body and salivary glands were higher at the wandering stage than at the feeding stage. I, J: qPCR 结果显示游走期脂肪体或唾液腺中 *Myc* 转录水平比取食期的 *Myc* 转录水平高 Results of qPCR showed that *Myc* transcriptional levels in fat body and salivary glands were higher at the wandering stage than at the feeding stage. * $P<0.05$ (*T* 检验 *T*-test).

2.4　异位表达 Ras^{V12} 或 *Raf* 上调 *Myc* 表达促进核内复制细胞生长

为检测在唾液腺和脂肪体发育中 Ras 信号是否可以促进 *Myc* 表达来促进核内复制细胞生长，我们利用 GAL4-UAS 系统（McGuire *et al.*, 2004）在黑腹果蝇幼虫脂肪体中激活 Ras 信号，将脂肪体表达 Gal4 品系 *Lsp2-Gal4* 雌虫与 $UAS\text{-}Ras^{V12}$，$UAS\text{-}Raf^{GOF}$ 雄虫分别杂交，游走期取 *Lsp2* > Ras^{V12} 或 *Lsp2* > Raf^{GOF} 的幼虫脂肪体与对照比较，发现 *Myc* 的转录水平有明显上调（图 4：A）。利用 *Ptc-Gal4* 在唾液腺中直接过表达 Ras^{V12} 或 Raf^{GOF} 会影响幼虫整体的发育，可能是由于 *Ptc-Gal4* 在虫体其他组织中的表达影响了虫体的整体发育。为了消除这种影响，我们结合 $Gal80^{ts}$ 系统，首先在低温下培养，这时 $Gal80^{ts}$ 具有抑制 Gal4 活性的功能，从而抑制 UAS 下游基因的表达，低温培养 12 h 后转至 30℃ 培养箱培养至游走期解剖获得唾液腺，同样 *Myc* 的转录水平明显上调（图 4：B）。



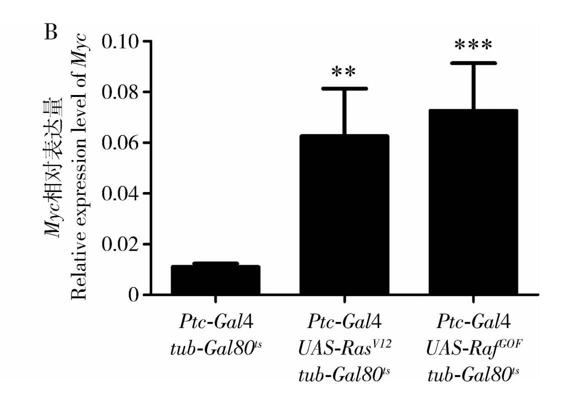


图 4　Ras 信号上调黑腹果蝇幼虫脂肪体（A）和唾液腺（B）中的 *Myc* 转录水平

Fig. 4　Ras signaling up-regulates *Myc* transcriptional level in larval fat body (A) and salivary glands (B) of *Drosophila melanogaster*

A：脂肪体过表达 Ras^{V12}（*Lsp2-Gal4*, $UAS\text{-}Ras^{V12}$）或 Raf^{GOF}（*Lsp2-Gal4*, $UAS\text{-}Raf^{GOF}$）上调 *Myc* 转录水平 Overexpression of Ras^{V12} (*Lsp2-Gal4*, $UAS\text{-}Ras^{V12}$) or Raf^{GOF} (*Lsp2-Gal4*, $UAS\text{-}Raf^{GOF}$) in fat body up-regulated *Myc* transcriptional level. B：唾液腺过表达 Ras^{V12}（*Ptc-Gal4*, $UAS\text{-}Ras^{V12}$, $tub\text{-}Gal80^{ts}$）或 Raf^{GOF}（*Ptc-Gal4*, $UAS\text{-}Raf^{GOF}$, $tub\text{-}Gal80^{ts}$）上调 *Myc* 转录水平 Overexpression of Ras^{V12} (*Ptc-Gal4*, $UAS\text{-}Ras^{V12}$, $tub\text{-}Gal80^{ts}$) or Raf^{GOF} (*Ptc-Gal4*, $UAS\text{-}Raf^{GOF}$, $tub\text{-}Gal80^{ts}$) in salivary glands up-regulated *Myc* transcriptional level. *Lsp2-Gal4* 为脂肪体细胞特异表达 Gal4 品系，*Ptc-Gal4* 是可以在唾液腺表达的 Gal4 品系，Gal4 与 UAS 结合后驱动下游基因在目的组织表达。*Lsp2-Gal4* transgenes are specifically expressed in fat body cells, and *Ptc-Gal4* is active in salivary glands. Gal4 binds to UAS and activates transcription of downstream transgenes in the tissue of interest. $^{*}P<0.05$; $^{**}P<0.01$; $^{***}P<0.001$ (*T* 检验 *T*-test).

我们通过 Flp-FRT 技术（McGuire *et al.*, 2004）在黑腹果蝇脂肪体或唾液腺细胞制造克隆细胞，验证 Ras 信号是否通过 *Myc* 促进核内复制细胞生长。与 2.1 节家蚕后部丝腺研究结果一致，黑腹果蝇脂肪体和唾液腺也是核内复制细胞，通过细胞核染色我们可以看出，过表达 *Myc* 造成脂肪体或唾液腺细胞核增大（图 5：A–D）；与过表达 *Myc* 结果类似，过表达 Ras^{V12} 或 Raf^{GOF} 激活 Ras 信号并造成脂肪体或唾液腺细胞核增大（图 5：E–L）。这些结果说明 Ras 信号有可能通过 *Myc* 促进核内复制细胞生长。随后我们检测 Ras 信号是否可以激活克隆细胞中 *Myc* 的表达。通过 Myc 抗体染色可以发现，过表达 *Myc* 的克隆细胞中抗体染色明显蛋白水平高于周围野生型细胞（图 5：M–P）；激活 Ras 信号的克隆细胞中 *Myc* 表达水平明显高于周围野生型细胞（图 5：Q–X）。综上所述，Ras 信号促进核内复制细胞的生长，可以通过促进 *Myc* 的表达促进核内周期进程，从而促进核内复制细胞器官的发育。

3　讨论

核内复制细胞的细胞周期缺少有丝分裂期 M 期，这类细胞普遍存在于动植物体内，对动植物发育非常重要（Edgar and Orr-Weaver, 2001）。黑腹果蝇中，唾液腺与家蚕后部丝腺是同源组织，唾液腺和脂肪体都是幼虫发育阶段重要的核内复制细胞，有利于我们更好地研究它们之间的相互关系以及对核内复制细胞的影响。脂肪体和唾液腺随着发育进程不断生长，这类器官细胞 DNA 复制进程受 *CycE/CDK2* 调控，进入细胞间期后，*CycE/CDK2* 失活从而允许复制复合体前体组装为下一次 DNA 复制做准备（Follette *et al.*, 1998；Weiss *et al.*, 1998）。E2F1 在细胞间期促进 *CycE* 的表达并启动 DNA 复制的开始（Zielke *et al.*, 2011）。除幼虫组织外，雌成虫卵

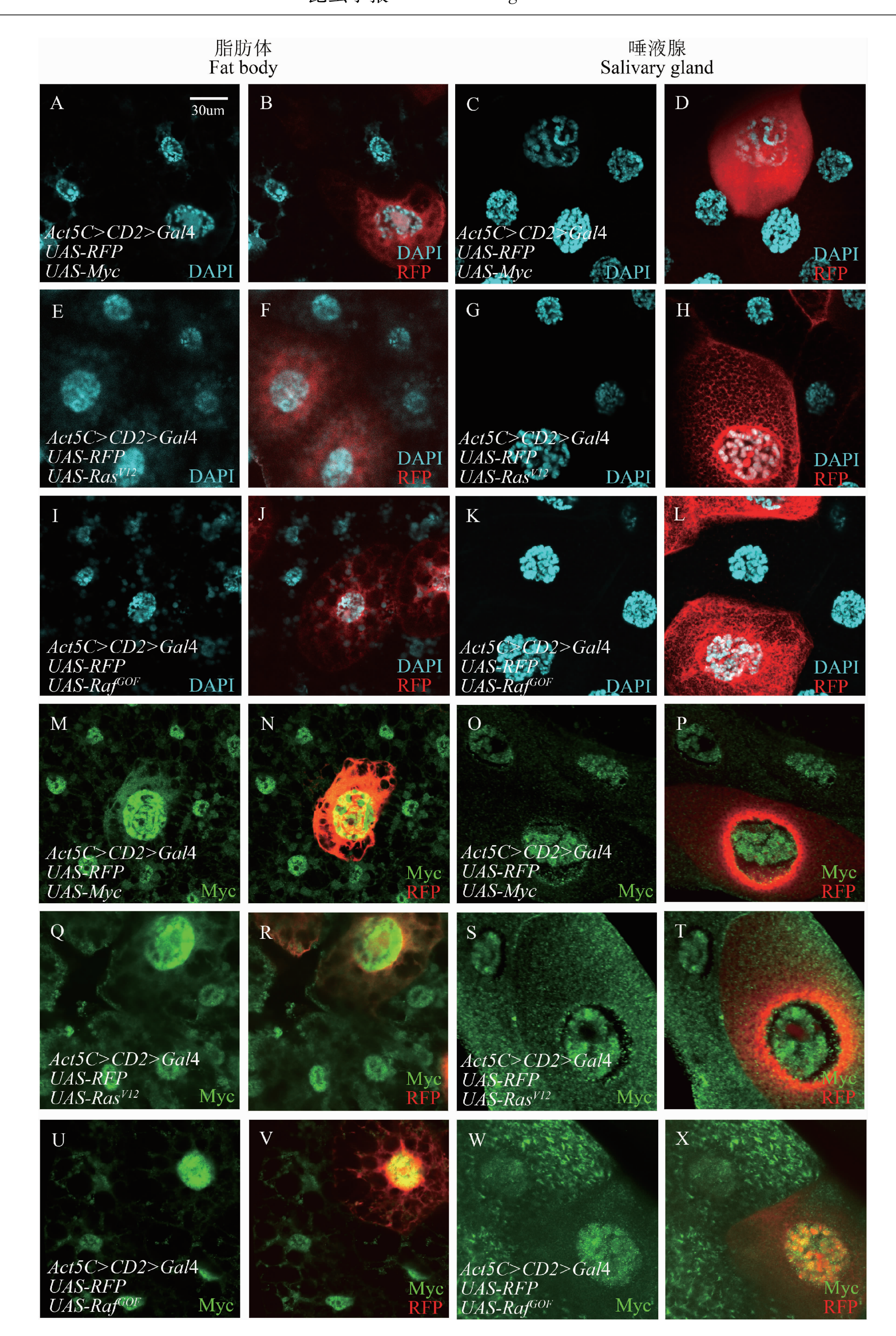


图 5 Ras 信号激活黑腹果蝇幼虫脂肪体和唾液腺细胞中 *Myc* 的表达

Fig. 5 Ras signaling activates *Myc* expression in fat body and salivary gland cells of *Drosophila melanogaster* larvae

左 2 列小图为脂肪体；右 2 列小图为唾液腺。Two left columns of figures are fat body, while two right columns of figures are salivary gland. A – L：过表达 *Myc*(*Act5C* > *CD2* > *Gal4*, *UAS-RFP*, *UAS-Myc*), *Ras*^{V12} (*Act5C* > *CD2* > *Gal4*, *UAS-RFP*, *UAS-Ras*^{V12})或 *Raf*^{GOF} (*Act5C* > *CD2* > *Gal4*, *UAS-RFP*, *UAS-Raf*^{GOF})增大脂肪体或唾液腺细胞体积 Overexpression of *Myc* (*Act5C* > *CD2* > *Gal4*, *UAS-RFP*, *UAS-Myc*), *Ras*^{V12} (*Act5C* > *CD2* > *Gal4*, *UAS-RFP*, *UAS-Ras*^{V12}) or *Raf*^{GOF} (*Act5C* > *CD2* > *Gal4*, *UAS-RFP*, *UAS-Raf*^{GOF}) increased cell size of fat body or salivary gland; M – X：过表达 *Ras*^{V12} 或 *Raf*^{GOF} (*Act5C* > *CD2* > *Gal4*, *UAS-RFP*, *UAS-Raf*^{GOF})上调细胞的 Myc 蛋白水平 Overexpression of *Ras*^{V12} or *Raf*^{GOF} (*Act5C* > *CD2* > *Gal4*, *UAS-RFP*, *UAS-Raf*^{GOF}) up-regulated the Myc protein level. > 标示转位酶识别位点(flippase recognition target, FRT)。Symbol > marks flippase recognition target. 图中红色 RFP 表达细胞表示过表达 *Ras*^{V12}, *Raf*^{GOF} 和 *Myc*，非红色 RFP 表达细胞表示对照。图中绿色为 Myc 抗体染色，蓝色为 DAPI 染色。RFP expressed cells (red) show *Ras*^{V12}, *Raf*^{GOF} and *Myc* overexpressed cells, and non-RFP expressed cells show the control cells. In this figure, green means Myc antibody staining and blue means DAPI staining.

巢中，由生殖干细胞分化出的营养细胞和包裹卵室的滤泡细胞也是核内复制细胞（Hammond and Laird, 1985）。变态发育过程中，大多数幼虫核内复制细胞组织将被消化或溶解，从而满足成虫组织的发育。这类组织的发育与 *Myc* 转录水平和蛋白水平呈正相关（图 3），激活 *Myc* 或 Ras 信号增大细胞体积（图 5：A－L），说明 *Myc* 和 Ras 信号在调控核内复制细胞中非常重要。

Ras 信号与大量细胞周期进程中的调节者或影响者相互关联，正向调控 CDKs, Cyclins 和 CDK 抑制者等，从而对细胞周期造成不同的影响。在有丝分裂细胞中，Ras 信号调控 G_1 期向 S 期的转变（Prober and Edgar, 2000, 2002）。在核内复制细胞中，果蝇 Ras 信号促进前胸腺细胞和唾液腺细胞体积增大（Caldwell *et al.*, 2005; Choubey and Roy, 2016），家蚕后部丝腺 Ras 信号上调 *CycE* 和 *Cyclin-D* 来促进核内复制（Ma *et al.*, 2011）。Ras 信号激活 *Myc* 的表达（图 1 和 4；图 5：Q－X），Myc 可调控 CycE 等细胞周期蛋白的表达（Skouteris and Schroder, 1996; Steiner *et al.*, 1996; Horiuchi *et al.*, 2012），但 Ras 信号对 CycE 或 CycD 的调控作用由 Myc 介导的唯一性还需后续实验进一步验证。在脂肪体和唾液腺细胞中过表达 Ras^{V12} 或 Raf^{GOF} 激活 Ras 信号确实增大了细胞体积（图 5：E－L）。说明 Ras 信号对核内复制细胞生长的促进作用具有保守性，但下游靶标基因的探索研究很少，Myc 极有可能是关键候选者之一。

Myc 影响核内复制速率，过表达 *Myc* 增加 DNA 量和细胞核体积，降低或敲除 *Myc* 有相反的效果（Maines *et al.*, 2004; Pierce *et al.*, 2004, 2008; Demontis and Perrimon, 2009）。Myc 对核内复制的影响据推测可能是通过调控下游靶标基因，这些靶标基因介导核糖体生物合成和翻译速率，但是 *Myc* 对 DNA 复制的直接影响目前还不清楚。*Myc* 随着核内复制细胞组织的发育，转录水平和蛋白水平逐渐上调（图 3），说明 *Myc* 与这类组织的发育有正相关。在果蝇翅芽中，Ras 信号可以增加 *Myc* 的蛋白水平而不影响转录水平（Prober and Edgar, 2000），而我们发现在家蚕后部丝腺以及黑腹果蝇脂肪体和唾液腺中激活 Ras 信号上调 *Myc* 转录和蛋白水平（图 1 和 4；图 5：Q－X），说明 Ras 信号调控 *Myc* 在不同类型细胞中有可能存在不同机理，但在不同昆虫的核内复制细胞中的调控机理又具有保守性。

综上所述，我们通过前期发现 Ras 信号调控家蚕后部丝腺发育可以激活 *Myc* 转录，再运用 Gal4/UAS 和 Flp-FRT 系统等遗传学工具在果蝇中验证 Ras 信号调控 *Myc* 的转录与蛋白水平，从而促进核内复制细胞的生长。下一步我们将在核内复制细胞中探索 Ras 信号和 *Myc* 之间的调控介导因子，完善 Ras 信号调控 *Myc* 的分子机理，为核内复制细胞发育的调控机制研究提供理论基础。

参考文献（References）

Aktas H, Cai H, Cooper GM, 1997. Ras links growth factor signaling to the cell cycle machinery via regulation of cyclin D1 and the Cdk inhibitor p27KIP1. *Mol. Cell. Biol.*, 17(7): 3850－3857.

Avruch J, Khokhlatchev A, Kyriakis JM, Luo Z, Tzivion G, Vavvas D, Zhang XF, 2001. Ras activation of the Raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade. *Recent Prog. Horm. Res.*, 56: 127－155.

Britton JS, Edgar BA, 1998. Environmental control of the cell cycle in *Drosophila*: nutrition activates mitotic and endoreplicative cells by distinct mechanisms. *Development*, 125(11): 2149－2158.

Caldwell PE, Walkiewicz M, Stern M, 2005. Ras activity in the *Drosophila* prothoracic gland regulates body size and developmental rate via ecdysone release. *Curr. Biol.*, 15(20): 1785－1795.

Calvi BR, 2013. Making big cells: one size does not fit all. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110(24): 9621－9622.

Choubey PK, Roy JK, 2016. Rab11, a vesicular trafficking protein, affects endoreplication through Ras-mediated pathway in *Drosophila melanogaster*. *Cell Tissue Res.*, 367(2): 269－282.

Crews CM, Erikson RL, 1993. Extracellular signals and reversible protein phosphorylation: what to Mek of it all. *Cell*, 74(2): 215－217.

Demontis F, Perrimon N, 2009. Integration of Insulin receptor/Foxo signaling and dMyc activity during muscle growth regulates body size in *Drosophila*. *Development*, 136(6): 983.

Edgar BA, Nijhout HF, 2004. Growth and Cell Cycle Control in *Drosophila*. Cold Spring Harbor Monograph Archive, North America. 23－83.

Edgar BA, Orr-Weaver TL, 2001. Endoreplication cell cycles: more for less. *Cell*, 105(3): 297－306.

Follette PJ, Duronio RJ, O'Farrell PH, 1998. Fluctuations in cyclin E levels are required for multiple rounds of endocycle S phase in *Drosophila*. *Curr. Biol.*, 8(4): 235－238.

Gallant P, 2013. Myc function in *Drosophila*. *Cold Spring Harbor Perspect. Med.*, 3(10): a014324.

Gallant P, Shiio Y, Cheng PF, Parkhurst SM, Eisenman RN, 1996. Myc and Max homologs in *Drosophila*. *Science*, 274(5292): 1523－1527.

Hammond MP, Laird CD, 1985. Chromosome structure and DNA replication in nurse and follicle cells of *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma*, 91(3－4): 267－278.

Horiuchi D, Kusdra L, Huskey NE, Chandriani S, Lenburg ME, Gonzalez-Angulo AM, Creasman KJ, Bazarov AV, Smyth JW, Davis SE, Yaswen P, Mills GB, Esserman LJ, Goga A, 2012.

MYC pathway activation in triple-negative breast cancer is synthetic lethal with CDK inhibition. *J. Exp. Med.*, 209(4): 679–696.

Hulf T, Bellosta P, Furrer M, Steiger D, Svensson D, Barbour A, Gallant P, 2005. Whole-genome analysis reveals a strong positional bias of conserved dMyc-dependent E-boxes. *Mol. Cell. Biol.*, 25(9): 3401–3410.

Khokhlatchev AV, Canagarajah B, Wilsbacher J, Robinson M, Atkinson M, Goldsmith E, Cobb MH, 1998. Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation. *Cell*, 93(4): 605–615.

Knoblich JA, Sauer K, Jones L, Richardson H, Saint R, Lehner CF, 1994. Cyclin E controls S phase progression and its down-regulation during *Drosophila* embryogenesis is required for the arrest of cell proliferation. *Cell*, 77(1): 107–120.

Lee HO, Davidson JM, Duronio RJ, 2009. Endoreplication: polyploidy with purpose. *Gene Dev.*, 23(21): 2461–2477.

Loo LW, Secombe J, Little JT, Carlos LS, Yost C, Cheng PF, Flynn EM, Edgar BA, Eisenman RN, 2005. The transcriptional repressor dMnt is a regulator of growth in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Biol.*, 25(16): 7078–7091.

Lusk JB, Lam VY, Tolwinski NS, 2017. Epidermal growth factor pathway signaling in *Drosophila* embryogenesis: tools for understanding cancer. *Cancers*, 9(2): E16.

Ma L, Ma Q, Li X, Cheng L, Li K, Li S, 2014. Transcriptomic analysis of differentially expressed genes in the *Ras1* (*CA*)-overexpressed and wildtype posterior silk glands. *BMC Genomics*, 15(1): 182.

Ma L, Xu H, Zhu J, Ma S, Liu Y, Jiang RJ, Xia Q, Li S, 2011. *Ras1* (*CA*) overexpression in the posterior silk gland improves silk yield. *Cell Res.*, 21(6): 934–943.

Maines JZ, Stevens LM, Tong X, Stein D, 2004. *Drosophila* dMyc is required for ovary cell growth and endoreplication. *Development*, 131(4): 775–786.

Marais R, Light Y, Paterson HF, Marshall CJ, 1995. Ras recruits Raf-1 to the plasma membrane for activation by tyrosine phosphorylation. *EMBO J.*, 14(13): 3136–3145.

Marais R, Wynne J, Treisman R, 1993. The SRF accessory protein Elk-1 contains a growth factor-regulated transcriptional activation domain. *Cell*, 73(2): 381–393.

McGuire SE, Roman G, Davis RL, 2004. Gene expression systems in *Drosophila*: a synthesis of time and space. *Trends Genet.*, 20(8): 384–391.

Muthuswami M, Ramesh V, Banerjee S, Viveka Thangaraj S, Periasamy J, Bhaskar Rao D, Barnabas GD, Raghavan S, Ganesan K, 2013. Breast tumors with elevated expression of 1q candidate genes confer poor clinical outcome and sensitivity to Ras/PI3K inhibition. *PLoS ONE*, 8(10): e77553.

Penzo-Méndez AI, Stanger BZ, 2014. Cell competition in vertebrate organ size regulation. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.*, 3(6): 419–427.

Pierce SB, Yost C, Anderson SA, Flynn EM, Delrow J, Eisenman RN, 2008. *Drosophila* growth and development in the absence of dMyc and dMnt. *Dev. Biol.*, 315(2): 303–316.

Pierce SB, Yost C, Britton JS, Loo LWM, Flynn EM, Edgar BA, Eisenman RN, 2004. dMyc is required for larval growth and endoreplication in *Drosophila*. *Development*, 131(10): 2317–2327.

Prober DA, Edgar BA, 2000. Ras1 promotes cellular growth in the *Drosophila* wing. *Cell*, 100(4): 435–446.

Prober DA, Edgar BA, 2002. Interactions between Ras1, dMyc, and dPI3K signaling in the developing *Drosophila* wing. *Gene Dev.*, 16(17): 2286–2299.

Ren F, Shi Q, Chen Y, Jiang A, Ip YT, Jiang H, Jiang J, 2013. *Drosophila* Myc integrates multiple signaling pathways to regulate intestinal stem cell proliferation during midgut regeneration. *Cell Res.*, 23(9): 1133–1146.

Rodriguez-Viciana P, Tetsu O, Oda K, Okada J, Rauen K, McCormick F, 2005. Cancer targets in the Ras pathway. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 70: 461–467.

Rommel C, Hafen E, 1998. Ras-a versatile cellular switch. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 8(4): 412–418.

Skouteris GG, Schroder CH, 1996. *C-myc* is required for the G_0/G_1-S transition of primary hepatocytes stimulated with a deleted form of hepatocyte growth factor. *Biochem. J.*, 316(3): 879–886.

Steiner P, Rudolph B, Muller D, Eilers M, 1996. The functions of Myc in cell cycle progression and apoptosis. *Prog. Cell Cycle Res.*, 2: 73–82.

Stokoe D, Macdonald SG, Cadwallader K, Symons M, Hancock JF, 1994. Activation of Raf as a result of recruitment to the plasma membrane. *Science*, 264(5164): 1463–1467.

Treisman R, 1996. Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 8(2): 205–215.

Weiss A, Herzig A, Jacobs H, Lehner CF, 1998. Continuous *Cyclin E* expression inhibits progression through endoreduplication cycles in *Drosophila*. *Curr. Biol.*, 8(4): 239–242.

Weng AP, Millholland JM, Yashiro-Ohtani Y, Arcangeli ML, Lau A, Wai C, Del Bianco C, Rodriguez CG, Sai H, Tobias J, Li Y, Wolfe MS, Shachaf C, Felsher D, Blacklow SC, Pear WS, Aster JC, 2006. c-Myc is an important direct target of Notch1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Gene Dev.*, 20(15): 2096–2109.

Xin HH, Zhang DP, Chen RT, Cai ZZ, Lu Y, Liang S, Miao YG, 2015. Transcription factor Bmsage plays a crucial role in silk gland generation in silkworm, *Bombyx mori*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 90(2): 59–69.

You Z, Saims D, Chen S, Zhang Z, Guttridge DC, Guan KL, MacDougald OA, Brown AM, Evan G, Kitajewski J, Wang CY, 2002. Wnt signaling promotes oncogenic transformation by inhibiting c-Myc-induced apoptosis. *J. Cell Biol.*, 157(3): 429–440.

Zielke N, Kim KJ, Tran V, Shibutani ST, Bravo MJ, Nagarajan S, van Straaten M, Woods B, von Dassow G, Rottig C, Lehner CF, Grewal SS, Duronio RJ, Edgar BA, 2011. Control of *Drosophila* endocycles by E2F and CRL4 (CDT2). *Nature*, 480(7375): 123–127.

（责任编辑：马丽萍）